由*Pythium helicoides*引起之巴西野牡丹根腐病

黃晉興[1,2]

[1.] 臺中縣霧峰鄉行政院農委會農業試驗所植物病理組

[2.] 聯絡作者，電子郵件：jhhuang@wufeng.tari.gov.tw，傳眞：+886-4-2330-2803

接受日期：中華民國 97 年 10 月 29 日

摘　要

黃晉興. 2009. 由*Pythium helicoides* 引起之巴西野牡丹根腐病 植病會刊 18: 51-56.

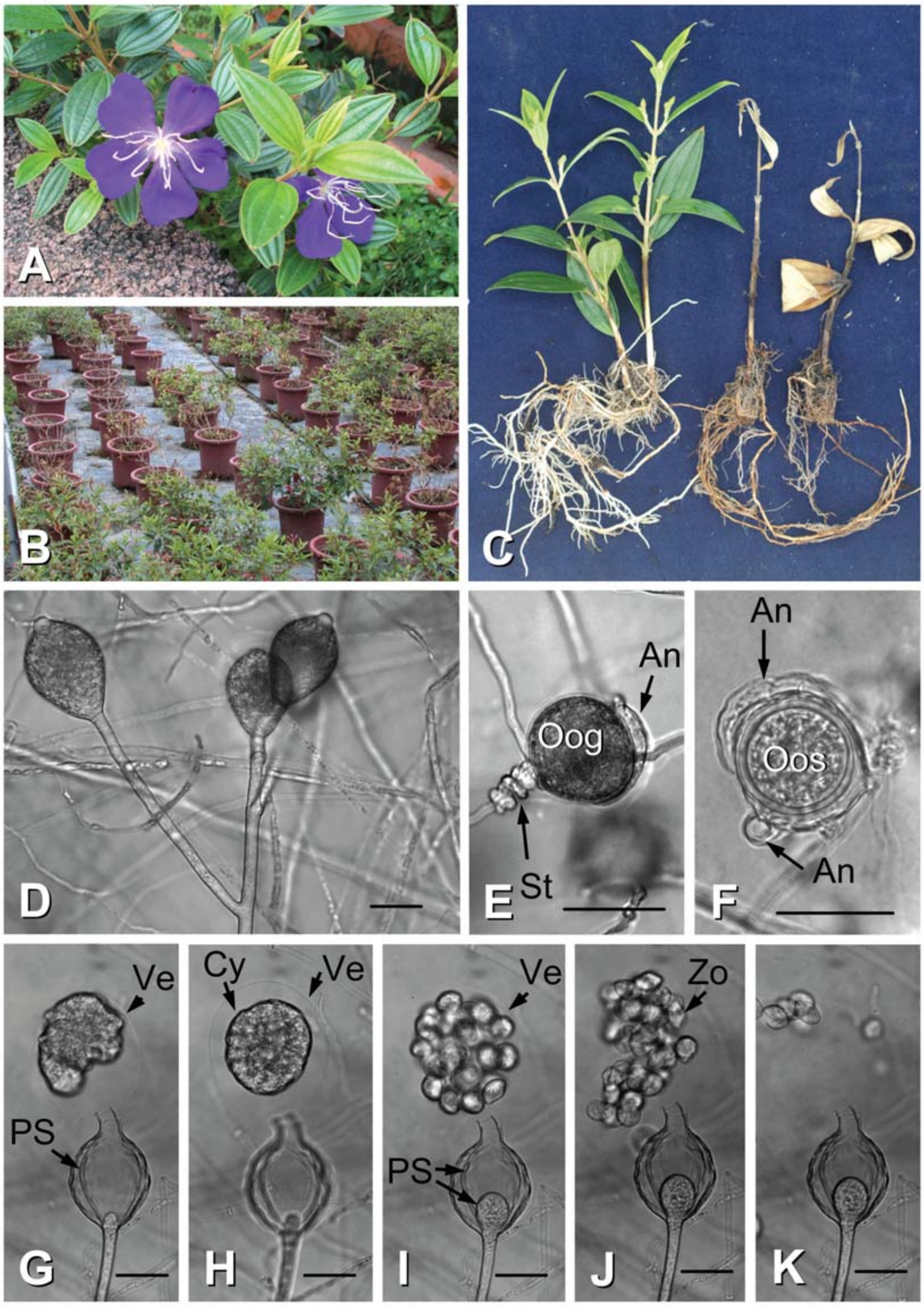
2004 年田間調查發現盆栽巴西野牡丹易發生根腐病，罹病株呈現葉片褪色、落葉及植株枯萎的病徵，而根部則褐化腐敗。自罹病植株根部可分離得一種腐霉菌 (*Pythium* sp.)，在蔬菜汁培養基上，該菌菌絲透明無隔，直徑可達 7 μm，孢囊亞球形 (subglobose) 或卵形 (ovoid)，平均大小爲 35×28 μm，有乳突，孢囊柄多分枝；游走子靜止子平均大小爲 12.0 μm，孢囊釋放游走子後易內再生；藏卵器頂生或間生，平均大小爲 34.5 μm；每個藏卵器有 1-4 藏精器附著，藏精器呈延長形 (elongate) ，平均大小爲 20.8×5.6 μm，藏精器柄常纏旋藏卵器基部；卵孢子爲球形 (globose) 或亞球形 (subglobose)，淡褐色，非充滿型 (aplerotic)，平均大小爲 29.0 μm，依上述之形態特性，鑑定此菌爲 *Pythium helicoides* Drechsler。本菌菌絲於 12-40 ℃可生長，最適溫爲 36 ℃，生長速率可達 3.8 cm/day；於溫室經人工接種確定該菌對巴西野牡丹具病原性，25 ℃ 以上可造成嚴重之根腐，除了巴西野牡丹之外，本菌亦可危害迷你玫瑰，但不危害番茄、胡瓜、白菜及豌豆。

關鍵詞：巴西野牡丹、根腐病、*Pythium helicoides*

巴西野牡丹 (*Tibouchina semidecandra* Cogn.)，又稱紫花野牡丹 (英名爲Glory flower, Princess flower) ，爲一種新興觀賞用之常綠小灌木 (圖一，A)，由於其花色鮮艷紫色、栽培容易且可連續開花，深受栽培者與消費者喜愛。2004 年夏季於台中縣霧峰鄉一處盆花栽培農場發現巴西野牡丹植株大量死亡，植株呈現葉片褪色、落葉、枯萎的病徵 (圖一，B)，發病率高達 80% 以上，而根部出現褐化腐敗的現象 (圖一，C)，隔年夏天，同一塊田又再次發現相同病徵之病害，而其他盆花農場陸續出現相同病害，嚴重影響產量，故本文探討此病害之病因及發病條件，以提供栽培管理之參考。

於 3 處農場各取回 10-20 株巴西野牡丹病株，用自來水漂洗根部，每株切取根 5 片段 (每段1 cm長)，不經表面消毒直接以無菌水漂洗三次，以滅菌過之吸水紙吸去游離水，置於 2% 水瓊脂 (Water Agar，WA) 平板上，室溫環境下 (25-30℃) 培養 2-3 天，待長出菌絲後，切取單一菌絲尖端培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato dextrose agar，PDA) 、10%蔬菜汁瓊脂 (10% V8-juice agar，10% VA) 或離心過的蔬菜汁瓊脂 (10% centrifuged V8-juice agar，10% CVA) 培養基，供爾後病原性測定及鑑定用。

將所分離之菌培養於 10% VA 或 10% CVA 平板，室溫下 (25-30 ℃) 培養 4-7 天，在培養基上只見少量卵孢子產生，但未見孢囊，另將供試菌培養於 10%VA 平板 3 天之供試菌，切下菌絲塊 ($10\times10\times^{3}$ mm^3) 以無菌水漂洗 3 次 (每次 20 分鐘)，再置於盛有 8 ml 無菌水之玻璃培養皿內 (直徑6 cm)，於 24℃ 定溫箱培養 20-24 hrs，再置於 8℃ 定溫箱 30 min，最後於室溫下 (25-30 ℃) 6-12 hr 後，於光學顯微鏡下可觀察得大量孢囊產生，爾後可見游走子釋放。又將菌絲塊另培養於盛有 10% 蔬菜汁培養液 (V8-juice) 8 ml 之培養皿中 (直徑 6 cm) ，於室溫下 2 天後以無菌水置換培養液漂洗 3 次，5-7 天可得大量有性世代之產生，並可觀察得藏精器、藏卵器與卵孢子的形態特徵。該菌菌絲透明無隔，直徑可達 7 μm，孢囊亞球形 (subglobose) 或卵形



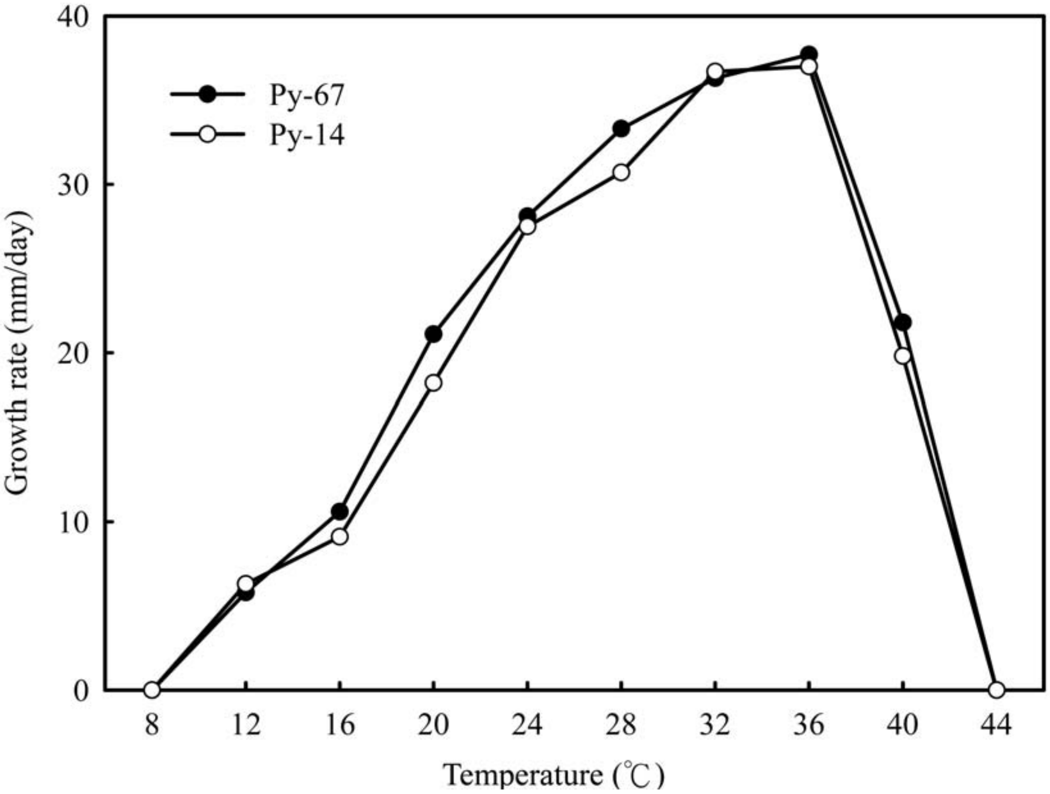
圖一、巴西野牡丹根腐病及其病原菌 *Pythium helicoides*。(A) 巴西野牡丹開花株；(B) 田間盆栽植株失水落葉之病徵；(C) 根腐病徵 (左為健康株之對照)；(D) 倒卵形有乳突之孢囊 (E) 藏精器 (An: Antheridium) 的柄 (St: Stalk) 常纏捲於藏卵器 (Oog: oogonium) 柄 (箭頭指處)；(F) 非充滿型的卵孢子 (Oos: oospore)；(G-K) 內增生之孢囊 (PS: proliferating sporangium)，孢囊內的原生質 (Cy: Cytoplasma) 釋出於泡囊 (Ve: Vesicle) 中，游走子 (Zo: Zoospore) 於其中成形而游出。黑色橫線條代表長度 25 μm。

Fig. 1. Root rot of *Tibouchina semidecandra* and its pathogen- *Pythium helicoides*. (A) The flowers of *Tibouchina semidecandra*. (B) Disease plants in the field. (C) Root rot symptom of *Tibouchina semidecandra*. (Left is control.) (D) The papillate sporangia. (E) Antheridia (An) stalks (St) always wrap around the oogonial (Oog) stalk in a few turns. (F) The aplerotic oospore (Oos). (G-K) Cytoplasma (Cy) discharged from the proliferated sporangium (PS) into the vesicle (Ve). Zoospores (Zo) formed in the vesicle and released. Bar=25 μm.

(ovoid) 有乳突 (圖一，D)，大小爲 28-44×23-33 μm (Avg. 35×28 μm)，孢囊柄易分枝，藏卵器外表光滑、多頂生而少數間生，大小爲 27-40 μm (Avg. 34.5 μm)；每個藏卵器附有1-4藏精器，藏精器多延長形 (elongate)，大小爲 18-22.5×5-6.25 μm (Avg. 20.8×5.6 μm)，藏精器柄常纏旋藏卵器基部 (圖一，E)；卵孢子球形或亞球形，淡褐色，非充滿型 (aplerotic)，大小爲 22.5-35 μm (Avg. 29.0 μm)，壁厚 1.25-2.5 μm (Avg. 1.8 μm) (圖一，F)；游走子腎形雙鞭毛，靜止子大小爲 10-12.5 μm (Avg. 12.0 μm) (圖一，G-K)。依"Monograph of Genus *Pythium*"一書[7] 之檢索表及形態描述將此菌鑑定爲 *Pythium helicoides* Drechsler。

選取自巴西野牡丹根腐病株分離之腐霉菌 *P. helicoides* (菌株Py-67)、1997 年自盆栽玫瑰根腐病株分離之 *P. helicoides* (菌株Py-14)、自胡瓜分離之 *P. spinosum*、自番茄幼苗分離之 *P. aphanidermatum* 及自豌豆根部分離之 *P. myriotylum* 爲供試菌，供試菌接種源主要分爲游走子懸浮液及菌絲片段懸浮液。由前述培養於培養基 10%VA 3-5 天之供試菌，每皿菌絲塊添加20 ml 無菌水，經打碎器打碎成菌絲片段懸浮液，而游走子懸浮液培養方法如前述，並調整爲 1×10^4 spores/ml 之接種源。選取生長旺盛之巴西野牡丹，剪取 5-8 cm 枝條扦插培植於盛有泥炭土(Bio-mix) 之直徑5cm 穴盤中，在 25-35 ℃ 溫室內栽培 30-45 天，選取長出根之扦插苗移植於盛有泥炭土 3.5 吋底部有排水孔之塑膠軟盆中，每盆 3 株，移植 14-21 天後爲供試寄主植物。

另測試寄主範圍用之供試植株則爲巴西野牡丹、迷你玫瑰 (*Rosa hybrida* L.)、番茄 (*Lycopersicon esculentum* L.)、白菜 (*Brassica campestris* L.)、胡瓜 (*Cucumis sativus* L.) 及豌豆 (*Pisum sativum* L.)，株高 10-30 cm，種植於盛有泥炭土之 3.5 吋盆中。將前述方法製備菌絲片段懸浮液或游走子，倒入前述種植有供試作物之盆缽內，使接種源與根及莖基接觸，以無菌之 10%CVA 碎片爲對照組，將接種後之盆栽浸漬於盛有水深 3 cm 之塑膠盆內，於 24-32 ℃ 溫室中栽培，每處理 4 盆，每盆 3 株，觀察並記錄植株落葉、枯萎的病徵，結果僅巴西野牡丹及迷你玫瑰出現落葉、枯萎的外觀病徵，而番茄、白菜、胡瓜及豌豆皆未出現外觀病徵。巴西野牡丹接種 *P. helicoides* (菌株 Py-67 及 Py-14) 10 天開始出現植株落葉的病徵，28 天後發病率分別爲100% 及75%，且植株出現明顯的根腐 (圖一, C)



圖二、溫度對 *Pythium helicoides* 菌絲生長速率之影響。Py-67 及 Py-14 分別分離自巴西野牡丹及盆栽迷你玫瑰。
Fig. 2. Effect of temperatures on the mycelial growth rate of *Pythium helicoides*. The isolates Py-67 and Py-14 were respectively isolated from Glory flower and potted miniature rose.

表一、溫度對 Pythium helicoides 引起巴西野牡丹根腐病菌之影響

Table 1. The effect of temperature on the development of root rot of Tibouchina semidecandra induced by artificially inoculated with zoospores of Pythium helicoides

Temp. (℃)	Disease incidence % (Disease severity %)[1] Days after inoculation 7		14		21		28		Reisolation[2] rate (%)
15	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	44.4
20	0	(0)	0	(0)	0	(0)	22.2 c	(5.6 d)	88.8
25	22.2 b	(16.7 b)	55.6 c	(41.6 c)	55.6 c	(41.6 c)	66.7 b	(47.2 c)	100.0
30	33.3 b	(22.1 b)	88.9 b	(75.0 b)	88.9 b	(77.8 b)	100.0 a	(88.9 b)	100.0
35	75.0 a	(50.0 a)	100.0 a	(88.9 a)	100.0 a	(100.0 a)	100.0 a	(100.0 a)	100.0

[1] isease severity (%) = $\Sigma n_i \times i / N \times 4 \times 100\%$, n_i= plant number of i level, N= all plants.

[2] Reisolation rate of plants after 28 days inoculation.

，而迷你玫瑰接種上述 2 菌後，則於 14 天開始出現外觀病徵，28 天後發病率分別為 55% 及 65%，皆可再分離得原接種之病原菌。另外，胡瓜接種 *P. helicoides* (菌株Py-67) 28 天後有 10% 植株出現輕微根腐病徵，但不造成地上部病徵，經再分離確定為 *P. helicoides*，其他如番茄、白菜接種 *P. helicoides* (菌株 Py-67 及 Py-14) 皆未出現病徵，也未能自根部重新分離得 *P. helicoides*。而巴西野牡丹及迷你玫瑰接種 *P. aphanidermtum* (來自番茄)、*P. spinosum* (來自胡瓜) 及 *P. myiotylum* (來自豌豆) 等菌株 28 天後皆未出現病徵，但上述腐霉菌接種於原寄主則可造成根腐及植株枯死的病徵。

供試菌 (菌株 Py-67、Py-14) 移植於 10% VA 平板，在 8、12、16、20、24、28、32、36 ℃ 定溫箱中無光照培養，每個溫度 3 皿，每 24 小時畫記錄線 1 次，測量其生長速率，結果如圖二顯示，菌絲生長 8 ℃ 以下及 44 ℃ 以上不生長，最適溫為32-36℃，生長速率最高可達 38 mm/day，於 40 ℃ 菌絲生長仍可達 20 mm/day。將供試菌 *P. helicoides* (菌株 Py-67) 菌絲片段懸浮液接種源，倒入前述盆栽巴西野牡丹苗，以無菌之 10% CVA 碎片為對照組，接種後之盆栽浸漬於盛有水深3cm 之塑膠盆內，分別於15、20、25、30 與35 ℃ 生長箱中栽培 (光照 12 hrs)，每處理 3 盆，每盆 3 株，觀察並記錄發病率及發病度，將發病等級區分為 4 級：0 級—無地上部病徵；1 級—下位葉褪色或掉落；2級—半數葉片褪色或掉落；3級—超過半數葉片褪色或掉落；4級—植株死亡，計算其發病度 (disease severity) %= $\Sigma n_i \times i / N \times 4 \times 100\%$，$n_i$= 各級植株，N= 所有植株。於 28 天後取回植株分離病原菌。結果如表一顯示，供試植株接種 3 天於 30、35 ℃ 處理出現病徵，發病率 11.1 %；7 天後 25 ℃、30 ℃ 及 35 ℃ 處理皆出現病徵，發病率分別為22.2%、33.3% 及 75%，發病度分別為 16.7%、22.1% 及 50%；接種 28 天後，20 ℃、25 ℃、30 ℃ 及 35 ℃ 處理之發病率分別為 22.2%、55.5%、100% 及 100%，而發病度分別為 5.6%、47.2%、88.9% 及 100%，根部病原菌 *P. helicoides* 之分離率 89% 以上 (表一)，15 ℃ 之處理未見外觀病徵，無接種對照組根部未能分離得病原菌，顯示高溫有利病害發展。

Pythium helicoides 形態上最明顯的特徵是孢囊釋放游走子後會形成內再生 (internal nested proliferatious) 的孢囊 (圖一, G-K)，及藏精器柄 (antheridia stalk) 常捲繞藏卵器柄 (oogonia stalk) 或附近的菌絲 (圖一, E)，曾被誤鑑定為 *P. palingenes* (1)，主要是因為 *Pythium* 屬具有捲繞的藏精器柄者包括 *P. helicoids*、*P. oedochilum* 與 *P. palingenes* (2, 3, 4)，後二者藏精器有波形輪廓 (wavy contour) 而本菌藏精器表面平滑，為與前者區分之主要依據，然而在顯微觀察下並不容易分辨本菌藏精器有無波形輪廓；此外，本菌孢囊柄易分枝 (圖一, D)，與 *P. palingenes* 孢囊柄長而不易分枝不同(2, 3, 4)。在溫度反應方面，本菌耐高溫，菌絲生長最適溫為 36 ℃，於 40 ℃仍可生長，與 *P. oedochilum* 生長適溫 30 ℃，最高生長溫度 35 ℃ 顯然不同(5, 7)。*Pythium helicoids* 於日本造成嚴重的迷你玫瑰根腐病(5)，其病原菌形態與溫度反應皆與本菌特性極相似，而本菌在本研究接種試驗亦為害迷你玫瑰。在基因序列方面，本病原菌 (Py-67) 核醣體非轉錄區間之核酸序列 (NCBI 登錄編號 FJ348741) 與美國國家生物技術資訊中心網站 (NCBI) 所登錄之 8 個*P. helicoids* (6) 的序列，753 個鹼基中僅有 1 個不同 (資料未發表)，由上述的特性顯示本菌非 *P. palingenes*，而是 *P. helicoides*。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Huang, J. H. 2008. Root rot of *Tibouchina semidecandra* caused by *Pythium palingenes*. Plant

Pathol. Bull. 17: 69. (abstract, in Chinese)
2. Drechsler, C. 1930. Some new species of *Pythium*. J. of Washington Academy of Science. 20: 398-418.
3. Drechsler, C. 1939. Several species of *Pythium* causing blossom-end rot of watermelons. Phytopathology 29: 391-421.
4. Drechsler, C. 1941. Three species of *Pythium* with proliferous sporangia. Phytopathology 31: 478-507.
5. Kageyama, K., Aoyagi, T., Sunouchi, R., and Fukuii, H. 2002. Root Rot of Miniature Roses Caused by *Pythium helicoides*. J. Gen. Plant Pathol. 68: 15-20.
6. Kageyama, K., Senda, M., Asano, T., Suga, H., and Ishiguro, K. 2007. Intra-isolate heterogeneity of the ITS region of rDNA in *Pythium helicoids*. Mycol. Res. 111: 416-423.
7. Van der Plaats-niterink, A. J. 1981. Monograph of *Genus Pythium*. Studies in Mycology, No. 21, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 242 pp.

ABSTRACT

Huang, J. H.[1,2] 2009. First report of root rot of *Tibouchina semidecandra* caused by *Pythium helicoides* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 18: 51-56. ([1]Devision of Plant Pathology, Taiwan Agriculture Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C. [2]Corresponding author. E-mail: jhhuang@wufeng.tari.gov.tw, Fax: +886-4-2330-2803)

The potted Glory flower (*Tibouchina semidecandra* Cogn.) in the field was found to appear serious disease at Wufeng, Taichung in the summer of 2004. The main symptoms were leaf chlorosis followed by defoliation, and brown, water-soaked root rot. *Pythium* isolates were isolated from roots of disease plants. These isolates formed branched sporangial stalks and produced internal nested proliferous ellipsoidal papillate sporangia, spherical smooth oogonia, elongate antheridia, and aplerotic oospores. The mycelia could grow on the media from 12-40 ℃. The optimum temperature for hyphal growth was 36 ℃ with a growth rate of 38 mm/day. The microorganisms were identified as *P. helicoides* based on these characteristics. In pathogenicity tests, the pathogen caused the root rot and blight symptoms on Glory flower as in nature and induced the same symptoms of miniature rose. But it didn't cause any symptoms of tomato, cucumber, Chinese mustard and pea. The disease was more serious at higher temperature (35 ℃) than at lower temperature (20-25 ℃). After inoculation, the leaves turned yellow and the roots were water-soaked rot on the third day, and followed by leaf blight and root dieback after 7 days. This is the first report of root rot of *T. semidecandra* caused by *P. helicoides*.

Key words: *Tibouchina semidecandra*, root rot, *Pythium helicoides*